

OBTENÇÃO DE MONO E DIGLICERÍDEOS VIA CATÁLISE QUÍMICA E ENZIMÁTICA

MONICA B. CASARINI¹; ROSELI AP. FERRARI²

Nº 10204

Resumo

Com a produção de biodiesel, a quantidade de glicerina no mundo aumentou e tornou-se excessiva. Algumas possibilidades de uso dessa glicerina tem sido estudadas, como a produção de monoglicerídeos (MAG) e diglicerídeos (DAG) através da reação do glicerol com ácidos graxos. No presente trabalho foram usados dois tipos de catalisadores nas reações: ácido p-toluenosulfônico e enzima (lípase imobilizada de *Candida antarctica*, Novozym 435). Um planejamento experimental foi determinado com razão molar de glicerol:ácido oléico variando de 3:1 a 8:1, com 0,5 a 1,5% de lípase e temperatura de 50 a 70°C; ou com 1,0 a 2,5% de ácido p-toluenosulfônico e temperatura de 110 a 150°C. Cromatografia líquida de exclusão por tamanho (HPSEC) foi usada para quantificar triglicerídeos (TAG), DAG, MAG e ácidos graxos livres (AGL). A melhor produção de MAG e DAG apresentou-se na razão molar glicerol:ácido oléico de 8:1 em ambos os métodos. O uso de 2,5% de p-toluenosulfônico a 150°C, resultou em 38% de MAG e 53% de DAG. Com 1,5% de Novozym 435 a 50°C os rendimentos foram de 27% de MAG e 53% de DAG.

Abstract

With the biodiesel production, the amount of glycerin increases in the world and become excessive. Some possibilities of using this glycerin have been studied, like the monoglycerides (MAG) and diglycerides (DAG) production by reactions of glycerol with fatty acid. The present study used two different kinds of catalysts in the reactions: p-toluenesulfonic acid and enzyme (immobilized lipase from *Candida antarctica* Novozym 435). An experimental design was determined with glycerol to oleic acid molar ratio of 3:1 at 8:1, with 0.5 to 1.5% of lipase at 50 to 70°C; or with 1.0 to 2.5% of p-toluenesulfonic acid at 110 to 150°C. High-performance size exclusion chromatography (HPSEC) was used to evaluate triglycerides (TAG), DAG, MAG and free fatty acids (FFA). The best MAG and DAG productions were in the molar ratio of 8:1 for glycerol:oleic acid in both methods. The use of 2.5% p-toluenesulfonic acid at 150°C,

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Engenharia de Alimentos, FEA/UNICAMP, Campinas-SP, monica.casarini@gmail.com

² Orientador: Pesquisador, CCQA/ITAL, Campinas-SP

leading to a content of 38% of MAG and 53% of DAG. With 1.5% of Novozym 435 at 50°C the MAG and DAG yields were 27 and 53%, respectively.

Introdução

Desde janeiro de 2010, o diesel comercializado no Brasil contém obrigatoriamente 5% de biodiesel, segundo a Resolução nº 6/2009 do Conselho Nacional de Política Energética. O Brasil está entre os maiores produtores e consumidores de biodiesel do mundo com uma produção, em 2009, de mais de 1,5bi de litros. Com o aumento na produção do biodiesel cresceu a oferta de glicerina, que corresponde a 10-12% do produto formado na obtenção do mesmo. Já existe no Brasil capacidade instalada para produção de 430mi de litros de glicerina, cuja oferta é maior que a demanda, podendo gerar um problema se novos usos da mesma não forem criados (ANP, 2010).

Uma possibilidade de uso de glicerina está na produção de MAG, emulsificantes amplamente utilizados em alimentos, fármacos e cosméticos. Sua síntese pode ser conduzida de diversas formas, como a esterificação direta de glicerol com ácidos graxos (BANCQUART *et al.*, 2001), que também resulta na produção de DAG, os quais tem se tornado importantes ingredientes da dieta alimentar, pois podem ser empregados no controle da obesidade, problemas de coração, pressão arterial e dos teores de colesterol (YASUKAWA & KATSURAGI, 2004).

Industrialmente, a produção de MAG consiste na reação de glicerólise, reação de TAG com glicerol na presença de catalisadores inorgânicos sob altas temperaturas. Devido as altas temperaturas os produtos obtidos possuem diversas desvantagens, como baixo rendimento, cor escura e gosto de queimado (FREGOLENTE *et al.*, 2008). A sua substituição pela rota enzimática, com o emprego de lípases, tem se mostrado uma alternativa atrativa, pois temperaturas mais amenas são adotadas nesse processo, prevenindo a formação de produtos indesejáveis, implicando em baixo consumo energético e em produtos de melhor qualidade (FREGOLENTE *et al.*, 2008).

Esta pesquisa teve como objetivo a transformação da glicerina em MAG e DAG através de reações de glicerólise com catalisadores químico e enzimático, utilizando o planejamento experimental e tendo como base a análise estatística.

Material e Métodos

Para obtenção de MAG e DAG, foi utilizada glicerina purificada proveniente da produção de biodiesel e ácido oléico (marca Synth). O catalisador enzimático utilizado

foi a lipase comercial imobilizada Novozym 435 produzida por *Candida antártica*, e como catalisador químico, o ácido para-tolueno sulfônico.

Um planejamento fatorial 2^3 foi empregado para estudar os efeitos das variáveis independentes sobre a quantidade de MAG e DAG formados em cada tipo de reação e de catalisador utilizado (Tabela 1).

TABELA 1. Planejamento experimental para reação de glicerólise com ácido oléico via catálise química e enzimática.

Variáveis Independentes	Catálise Química (Nível)			Catálise Enzimática(Nível)		
	-1	0	+1	-1	0	+1
Conc. Catalisador (%), C	1	1,75	2,5	0,5	1,0	1,5
Temperatura (°C), T	110	130	150	50	60	70
Razão glicerol: ácido oléico, R	3:1	5,5:1	8:1	3:1	5,5:1	8:1

A análise dos teores de MAG, DAG, TAG e AGL foi efetuada segundo Schoenfelder (2003) por HPSEC (High Pressure Size Exclusion Chromatography) utilizando-se cromatógrafo líquido. Padrões de MAG, DAG, TAG e ácido oléico foram utilizados. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa Statistica 9.0 (Statsoft, 2009).

Resultados e Discussão

Através do planejamento experimental foi possível investigar os efeitos dos fatores reacionais de concentração de catalisador, temperatura reacional e razão glicerol:ácido oléico sobre os percentuais de MAG e DAG formados após as reações.

Catálise química

Os resultados obtidos das reações do ácido graxo com catalisador químico e das análises estatísticas encontram-se nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

TABELA 2. Valores experimentais da variável dependente (resposta) para glicerólise com ácido oléico via catálise química.

Ensaio	Variáveis independentes			Variáveis dependentes (%)		
	C	T	R	AGL	MAG	DAG
1	1,0 (-1)	110 (-1)	3:1 (-1)	77,49	2,84	7,62
2	2,5 (+1)	110 (-1)	3:1 (-1)	8,17	34,80	48,41
3	1,0 (-1)	150 (+1)	3:1 (-1)	1,41	40,12	51,62
4	2,5 (+1)	150 (+1)	3:1 (-1)	2,74	32,29	50,61
5	1,0 (-1)	110 (-1)	8:1 (+1)	83,96	3,30	2,62
6	2,5 (+1)	110 (-1)	8:1 (+1)	60,49	16,62	13,04
7	1,0 (-1)	150 (+1)	8:1 (+1)	7,49	45,24	42,56
8	2,5 (+1)	150 (+1)	8:1 (+1)	1,37	38,11	53,00
9	1,75 (0)	130 (0)	5,5:1 (0)	65,17	17,44	10,59
10	1,75 (0)	130 (0)	5,5:1 (0)	69,12	15,38	9,54

Analisando os resultados, observa-se que os ensaios 8 e 3 correspondem aos menores teores de AGL, de 1,37% e 1,41%, as maiores quantidades de MAG, de 38,11% e 40,12%, e de DAG formados, de 53,00% e 51,62%, respectivamente.

TABELA 3. Coeficientes de regressão associados ao modelo matemático codificado para a glicerólise do ácido oléico por catálise química – MAG e DAG.

Variável	Efeito	MAG		p	Efeito	DAG	
		MS	Erro puro			MS	Erro puro
Média global	24,6140	0,4606	0,0119		28,9610	0,2348	0,0052
Efeitos principais							
C	7,5800	1,0300	0,0860		15,1600	0,5250	0,0220
T	24,5500	1,0300	0,0267		31,5250	0,5250	0,0106
R	-1,6950	1,0300	0,3476		-11,7600	0,5250	0,0284
Efeito de interação							
C x T	-15,0600	1,0300	0,0435		-10,4450	0,5250	0,0320
C x R	-4,4850	1,0300	0,1437		-4,7300	0,5250	0,0703
T x R	7,1650	1,0300	0,0909		8,4250	0,5250	0,0396

Os valores mostrados em negrito na Tabela 3 são os significativos, considerando um intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). O efeito mais significativos foi de T, que apresentou efeito positivo sobre o rendimento em MAG e DAG. Para rendimento em DAG, o efeito de C e de R também foram significativos, sendo o primeiro positivo e o segundo negativo. A interação CxT foi a mais significativa, com efeito negativo.

Considerando apenas os fatores significativos, foi feita a Análise de Variância (ANOVA), conforme as Tabelas 4 e 5.

TABELA 4. Análise de variância associada ao modelo matemático codificado para a glicerólise com ácido oléico via catálise química – MAG.

Fonte de variação	GL*	SQ**	MQ***	F _{calculado}	F _{tabelado}	R ²
Regressão	2	1,66E+03	8,30E+02	12,08	4,74	0,78
Resíduo	7	4,81E+02	6,87E+01			
Falta de ajuste	6	4,79E+02	7,98E+01	37,59	234,0	
Erro puro	1	2,12E+00	2,12E+00			
Total	9	2,14E+03	-			

*GL: grau de liberdade **SQ: soma quadrática ***MQ: média quadrática

Na Tabela 4, observa-se que o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,78, indicando que o modelo explicou 78% da variação dos dados experimentais. Como $F_{\text{calculado}}$ para a regressão foi superior a F_{tabelado} , o modelo pode ser considerado preditivo. Do mesmo modo, como $F_{\text{calculado}}$ foi inferior a F_{tabelado} verificou-se que não houve falta de ajuste.

TABELA 5. Análise de variância associada ao modelo matemático codificado para a glicerólise com ácido oléico via catálise química – DAG.

Fonte de variação	GL	SQ	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}	R ²
Regressão	5	3,08E+03	6,17E+02	2,13	6,26	0,73
Resíduo	4	1,16E+03	2,89E+02			
Falta de ajuste	3	1,16E+03	3,85E+02	699,02	215,7	
Erro puro	1	5,51E-01	5,51E-01			
Total	9	4,24E+03	-			

Na Tabela 5, R^2 indica que o modelo explicou 73% da variação dos dados experimentais. O valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão foi inferior ao de F_{tabelado} , indicando

que o modelo não pode ser utilizado para predições. Além disso, o alto valor de $F_{\text{calculado}}$ em relação a F_{tabelado} , indicou que o modelo apresenta falta de ajuste.

Catalisador enzimático

Os resultados obtidos das reações do ácido graxo com catalisador enzimático encontram-se na Tabela 6.

TABELA 6. Valores experimentais da variável dependente (resposta) para glicerólise com ácido oléico via catálise enzimática.

Ensaio	Variáveis independentes			Variáveis dependentes (%)		
	C	T	R	AGL	MAG	DAG
1	0,5 (-1)	50 (-1)	3:1 (-1)	77,42	3,56	14,15
2	1,5 (+1)	50 (-1)	3:1 (-1)	46,16	11,79	40,67
3	0,5 (-1)	70 (+1)	3:1 (-1)	50,67	13,54	37,18
4	1,5 (+1)	70 (+1)	3:1 (-1)	12,60	25,54	49,89
5	0,5 (-1)	50 (-1)	8:1 (+1)	65,02	5,50	20,96
6	1,5 (+1)	50 (-1)	8:1 (+1)	6,88	26,55	53,01
7	0,5 (-1)	70 (+1)	8:1 (+1)	50,75	13,15	44,08
8	1,5 (+1)	70 (+1)	8:1 (+1)	11,11	25,16	51,04
9	1,0 (0)	60 (0)	5,5:1 (0)	20,76	25,19	49,67
10	1,0 (0)	60 (0)	5,5:1 (0)	25,22	24,87	49,60

Analisando-se a Tabela 6, após as reações de glicerólise via catálise enzimática, os experimentos responsáveis pelos maiores rendimentos apresentaram C de 1,5%. As maiores quantidades formadas de 26,55% MAG e 53,01% de DAG, correspondem ao ensaio 6.

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados das análises estatísticas para os dados de produção de MAG e de DAG, considerando $p < 0,05$.

TABELA 7. Coeficientes de regressão associados ao modelo matemático codificado para a glicerólise do ácido oléico por catálise enzimática – MAG e DAG.

Variável	Efeito	MAG		p	DAG		p
		MS	Erro puro		MS	Erro puro	
Média global	17,4850	0,0716	0,0026	41,0250	0,0157	0,0002	
Efeitos principais							
C	13,3225	0,1600	0,0076	19,5600	0,0350	0,0011	
T	7,4975	0,1600	0,0136	13,3500	0,0350	0,0017	
R	3,9825	0,1600	0,0256	6,8000	0,0350	0,0033	
Efeito de interação							
C x T	-1,3175	0,1600	0,0769	-9,7250	0,0350	0,0023	
C x R	3,2075	0,1600	0,0317	-0,0550	0,0350	0,3608	
T x R	-4,3675	0,1600	0,0233	-2,7750	0,0350	0,0080	

De todos os fatores, somente as interações CxT e CxR não foram significativas, segundo a Tabela 7. O efeito mais significativo para produção de MAG e DAG foi da concentração de catalisador, positivo. Considerando apenas os fatores significativos, foi feita a Análise de Variância (ANOVA), conforme as Tabelas 8 e 9, onde observa-se que os modelos não podem ser considerados preditivos e apresentaram falta de ajuste, conforme a comparação entre os valores de $F_{\text{calculado}}$ e os valores de F_{tabelado} .

TABELA 8. ANOVA para a glicerólise com ácido oléico via catálise enzimática – MAG.

Fonte de variação	GL	SQ	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}	R ²
Regressão	5	5,58E+02	1,12E+02	2,68	6,26	0,77
Resíduo	4	1,66E+02	4,16E+01			
Falta de ajuste	3	1,66E+02	5,54E+01	1082,69	215,7	
Erro puro	1	5,12E-02	5,12E-02			
Total	9	7,24E+02	-			

TABELA 9. ANOVA para a glicerólise com ácido oléico via catálise enzimática – DAG.

Fonte de variação	GL	SQ	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}	R ²
Regressão	5	1,42E+03	2,84E+02	5,64	6,26	0,88
Resíduo	4	2,01E+02	5,03E+01			
Falta de ajuste	3	2,01E+02	6,71E+01	27379,74	215,7	
Erro puro	1	2,45E-03	2,45E-03			
Total	9	1,62E+03	-			

Conclusão

A reação de glicerólise na presença de catalisador químico foi mais efetiva quanto à formação de MAG e DAG que a glicerólise via catálise enzimática.

Agradecimentos

Ao CNPq pela Bolsa PIBIC.

Referências Bibliográficas

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=20599&m=&t1=&t2=&t3=&t4=&ar=&ps=&cachebust=1271247610781>>. Acesso em: 14/04/2010.

BANCQUART, S.; VANHOVE, C.; POUILLOUX, Y.; BARRAULT, J. Glycerol transesterification with stearate over solid basic catalysts I: relationship between activity and basicity. *Applied Catalysis A*, v.218, p.1-11, 2001.

FREGOLENTE, P. B. L.; FREGOLENTE, L. V.; PINTO, G. M. F.; BATISTELLA, B. C.; WOLF-MACIEL, M. R.; FILHO, R. M. Monoglycerides and diglycerides synthesis in a solvent-free system by lipase-catalyzed glycerolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 146, p. 165-172, 2008.

SCHOENFELDER, W. Determination of monoglycerides, diglycerides, triglycerides and glycerol in fats by means of gel permeation chromatography. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 105, p. 45-48, 2003.

STATSOFT, STATISTICA version 9.0. Data analysis software system. Tulsa, StatSoft, Inc., 2009.

YASUKAWA, T.; KATSURAGI, Y. Diacylglycerols. In: FLICKINGER, B. D.; KATSURAGI, Y.; MATLOCK, M. G.; MATSUO, N.; TOKIMITSU, I.; YASUKAWA, T. (Ed.). *Diacylglycerol Oil*. Champaign: AOCS Press, p. 1-15, 2004.